大阪と科学教育 24, 17－22, 大阪府教育センター（2010）

大腸菌コンピテントセルを用いた遺伝子組換え実験

－ 市販実験キットの改良と授業や研修での活用 －

橘　　淳　治*

１．はじめに

近年のバイオ技術の進展はめざましく，バイオ技術を利用した医薬品や食品などが身近になり，DNA，バイオ，遺伝子組換えという言葉は日常的にも使われるようになってきた．

また，平成20年３月に告示された中学校学習指導要領では理科において，遺伝子がＤＮＡという物質であることに触れ，翌平成21年３月に告示の高等学校学習指導要領の生物基礎や生物では遺伝子やバイオテクノロジーについて理解させるとともに，理科においては目的意識をもって観察，実験を行うと明記されるなど，遺伝子組換え実験を授業等で扱う必要性がこれまで以上に高まった．

そこで，授業での遺伝子組換え実験の実施を前提に，市販の遺伝子組換え実験キットと，試薬メーカーのコンピテントセルという外来の遺伝子を取り込みやすくした大腸菌を用いた遺伝子組換え実験とその教員研修を行ったので報告する．

２．学校で行う遺伝子組換え実験

(1) 教育目的の遺伝子組換え実験

これまでの文部科学省の「組換えＤＮＡ実験指針」において，教育目的の遺伝子組換え実験の規則が規定されていたが，平成16年２月のカルタヘナ法（遺伝子組換え生物等規制法）の施行にともない，指針は廃止された．

これ以降，教育目的の遺伝子組換え実験は，カルタヘナ法に基づいて行うことになった．その結果，遺伝子組換え実験中及び保管中の拡散防止措置を講じ，安全管理体制をしっかり取ることにより，学校においても教育目的の遺伝子組換え実験が比較的簡単にできるようになった（詳しくは，文部科学省HPの「ライフサイエンスにおける安全の取組み」を参照）．

＊　大阪府教育センター

(2) 遺伝子組換え実験キット

教育目的の遺伝子組換え実験の必要性が高まり，国内外の色々なメーカーから遺伝子組換え実験キットが販売されている．

実験キットはメーカーごとに特徴はあるが，ほとんどは安全性が確認されている大腸菌に対して，標識となるホタルの発光遺伝子やGFP（クラゲの緑色蛍光タンパク）発現遺伝子，及び選択マーカーとしての抗生物質耐性遺伝子が組み込まれたプラスミド（環状DNA）を導入し，抗生物質の入った選択培地で培養して，遺伝子導入された大腸菌が作り出した発光や蛍光タンパクを視覚的に確認するものである．

この意味では遺伝子組換え実験と言うよりか遺伝子導入実験と言った方が適切かも知れない．

(3) コンピテントセル

大腸菌に限らず，生物の細胞は異物が細胞に簡単に入らないような細胞膜をもっている．そのため，プラスミドなどの外来ＤＮＡを大腸菌に与えても，ほとんど細胞内に取り込まれない．そこで，遺伝子組換え実験キットなどでは，形質転換溶液（カルシウムイオンの含まれた溶液）で，大腸菌の細胞膜を変化させて（細胞膜に傷をつけてボロボロの状態にして），外来遺伝子を取り込みやすくしたものを用いている．

一般的にはこのように外来遺伝子を取り込める状態にした細胞をコンピテントセルと呼ぶが，実習等で大腸菌（*E. coli* K-12株）を形質転換溶液で処理をしても外来遺伝子の取込み効率はあまり良くない．

これに対して，試薬メーカーのコンピテントセルは，キット付属の大腸菌を形質転換させたものに比べて，10^3倍程度の取込み効率があると言われている．

３．方法

(1) 遺伝子組換え実験キットによる方法

教育目的の遺伝子組換え実験キットは数社から販売されているが，小・中学校「理科」指導者養成長

期研修（以下，長期研修と呼ぶ）においては，授業での利用も考えて，実験操作の簡便なキットであるＳ社の「遺伝子組換え実験キット Basic Version」を使うこととした．

このキットは，大腸菌（*E. coli* K-12株），GFP遺伝子と選択マーカーであるアンピシリン耐性遺伝子の両方を組み込んだプラスミド，LBアンピシリン寒天培地，LB寒天培地，SOC培地，形質転換溶液，ピペット，ループ，コンラージ棒，チューブラック，オートクレーブバックなど実習に必要な物品一式が入っており，事前の準備の必要がほとんど無いものである（図１）．

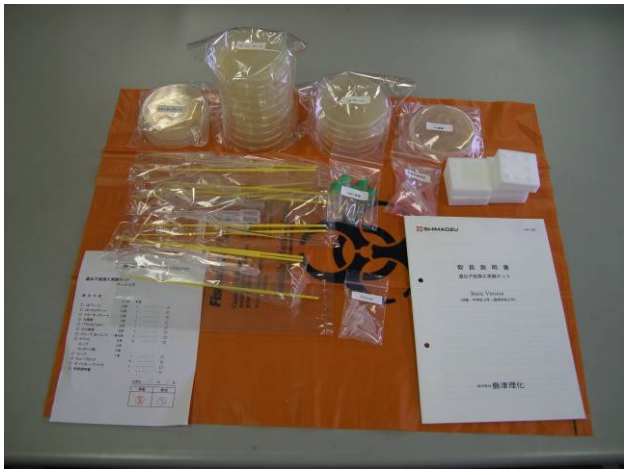

図１　Ｓ社の遺伝子組換え実験キット

① 理科指導者養成長期研修おける実習

12名の長期研修受講者においては，無菌操作や微生物の取り扱いに関する研修は終えており，また，学校に戻ってからも微生物を扱う実習とその指導ができるように，キットをそのまま使うのではなく，培地等の作製をも行い，キットで用いるのは大腸菌（*E. coli* K-12株），GFP及びアンピシリン耐性遺伝子プラスミドのみである．

研修の進め方は次の通りである．

（事前準備：午前中）

ⅰ）遺伝子組換え実験についての概要説明をする．

ⅱ）遺伝子組換え実験キットの内容確認及び，取扱説明書を熟読する．

ⅲ）実習に用いるシャーレ，マイクロチューブ等の洗浄と滅菌をする．

ⅳ）安全ピペット（ピペットマン）の使用法とその扱いについての練習をする．

ⅴ）大腸菌を培養するLB寒天培地（アンピシリン無し）とLB/アンピシリン寒天培地(アンピシリン入り)の２種類を作製する（表１）．

表１　LB/アンピシリン培地の組成

Bacto Tryptone	10g
Bacto Yeast Extract	5g
Bacto Agar	15g
NaCl	10g
5N NaOH	0.2ml
蒸留水	1L
Ampicilin(50mg/ml)	1ml(滅菌後添加)
(LB培地ではAmpicilinを添加しない)	

ⅵ）形質転換後の大腸菌のダメージを回復させるためのSOC培地を作製する（表２）．

表２　SOC培地の組成

Bacto Tryptone	10g
Bacto Yeast Extract	5g
NaCl	10g
5N NaOH	0.2ml
1mol/Lのグルコース	2mL(滅菌後添加)
蒸留水	1L

ⅶ）形質転換溶液を作製する（表３）．

表３　形質転換溶液の組成

1mol/Lの$MgCl_2$溶液	100μL
1mol/Lの$MgSO_4$溶液	100μL
SOC培地	10mL

ⅷ）培養するためのインキュベーター（孵卵器）の準備（37℃に温度調整など）をする．

ⅸ）ヒートショック用の投げ込みヒーターの準備（42℃に温度調整など）をする．

（遺伝子導入実験：午後）

ⅰ）１グループあたり，250μLの形質転換溶液が入ったマイクロチューブを４本用意し，これらを氷上に置いて冷やす．

ⅱ）大腸菌（*E. coli* K-12株）のコロニーを寒天プレートからループを用いて取り，形質転換溶液入りマイクロチューブに入れて撹拌する．

ⅲ）氷上で５分間静置する（大腸菌の細胞膜を変化させる）．

ⅳ）遺伝子導入を起こさせる２本のマイクロチューブに，安全ピペットを用いてGFPプラスミド溶液25μLずつ(遺伝子組換え実験キットが推奨する使用量の1/2量に減らしてある）を入れる（図２）．

これを，GFPプラスミド大腸菌とよぶことにする．

ⅴ）対照用の２本のマイクロチューブには滅菌水を25μLずつ入れる．

これを，対照大腸菌と呼ぶことにする．

図２　GFPプラスミドを大腸菌に導入させるための操作をしている理科指導者養成長期研修受講者

ⅵ）氷上で10分間静置する．

ⅶ）ヒートショックを与える（マイクロチューブを42℃の投げ込みヒーターを入れた水槽に１分間入れ，その後，氷上に２分間静置する）．

ⅷ）SOC培地を４本のマイクロチューブに250μLずつ入れて，大腸菌を回復させる．

ⅸ）37℃のインキュベーターで10分間静置する．

ⅹ）安全ピペットを用いて，マイクロチューブの大腸菌混合液を，下記の要領で２枚のLB寒天培地と２枚のLB/アンピシリン寒天培地に対して，各々100μL程度入れる．

LB寒天培地 ＋　GFPプラスミド大腸菌

LB/アンピシリン寒天培地 ＋　GFPプラスミド大腸菌

LB寒天培地 ＋　対照大腸菌

LB/アンピシリン寒天培地　＋　対照大腸菌

ⅹⅰ）各寒天培地について，コンラージ棒を用いて均一に広げる．

ⅹⅱ）プレートを逆さまにして，37℃のインキュベーターで１日間培養する．

（結果の確認：翌日または翌々日）

ⅰ）４種類の寒天培地について，肉眼でコロニー数（概数）やコロニーの色を確認する．

ⅱ）暗いところで紫外線ランプ（またはブラックライト)を当てて，コロニーの螢光の有無を判断する．

ⅲ）実験終了後は，自然界に組換え体を散逸させないため，実験に用いた器具などはオートクレーブ滅菌や漂白剤を用いた塩素滅菌を行ってから廃棄する．

② 実習の結果と考察

研修受講者の総てのグループにおいて，LB寒天培地（アンピシリンなしのLB寒天培地）で，GFPプラスミド大腸菌や対照大腸菌を培養したものは，抗生物質の添加がないので寒天培地一面が白くなるほど多くの大腸菌が成育していた．勿論，コロニーの数は多すぎて数えることが不可能であった．

LB/アンピシリン寒天培地(アンピシリン入りの寒天培地）に対して，対照大腸菌を培養したものは，対照大腸菌はアンピシリン耐性を持たないので大腸菌の成育は認められなかった．

LB/アンピシリン寒天培地に対して，GFPプラスミド大腸菌を培養したものは，１枚のプレートあたり０～53個（平均21個）の遺伝子導入大腸菌のコロニーが認められた（表４）．

表４　長期研修受講者による遺伝子導入大腸菌のコロニー数

検体番号	コロニー数
Sample１	4
Sample２	13
Sample３	43
Sample４	34
Sample５	8
Sample６	18
Sample７	53
Sample８	38
Sample９	0
Sample１０	19
Sample１１	0
Sample１２	25

12人中10人の研修受講者のサンプルにおいて，コロニーが形成され，大腸菌にプラスミドがうまく導入されたが，全くコロニーが形成されないものや著しく形成コロニー数の少ないものもあった．

この原因としては，すべての研修受講者のサンプルにおいてLB培地では大腸菌が増殖していたので，形質転換溶液等による大腸菌のダメージではなく，恐らく，ヒートショックや撹拌操作などがうまく行

かなかったものと推測される.

また，これらのコロニーにUVイルミネーターを用いて紫外線を当てるとGFP（Green Fluorescent Protein）タンパクによる緑色の蛍光が見られた（図３）.

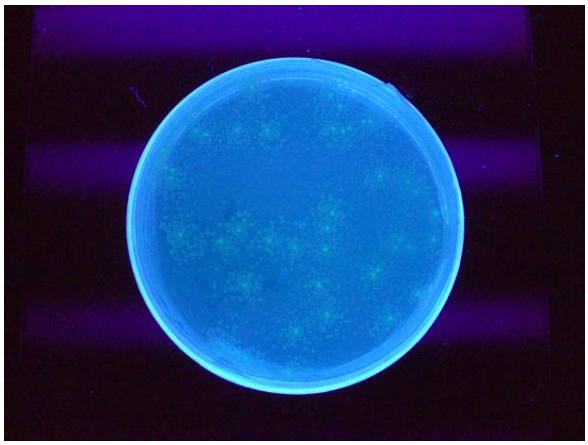

図３　UVイルミネーターで紫外線を当てて観察した，長期研修受講者による遺伝子導入大腸菌のコロニー

(2) 市販のコンピテントセルを用いる方法

市販のコンピテントセルは各メーカーから多数販売されているが，安全な大腸菌であり，入手の容易な Takara *E. coli* DH5α Competent Cells を用いて遺伝子導入実験を行った.

① 実験方法

基本的には，長期研修で行ったキットを用いた方法に準ずるが，プラスミドの導入効率を調べて学校の授業や教員研修での利用を考え，アンピシリン寒天培地での培養のみを行った.

このコンピテントセルは注文すると，メーカーから-80℃の冷凍状態で送られてくる.解凍と冷凍を繰り返すと形質転換効率が著しく低下するので，使用日に合わせてメーカーに発注すると良い.

実験の概要は次のとおりである.

ⅰ）250μLの形質転換溶液が入ったマイクロチューブを５本用意し，これらを氷上に置いて冷やす.

ⅱ）購入した *E. coli* DH5α Competent Cellsは，冷凍状態で100μLずつ分注されてマイクロチューブに入っているので，５本のみを取り出し，氷上で融解する.

ⅲ）100μL の*E. coli* DH5α Competent Cellsを，形質転換溶液入りマイクロチューブに入れて撹拌する.

ⅳ）氷上で５分間静置する.

ⅴ）遺伝子組換え実験キットに付属するGFPプラスミド溶液25μLずつ入れる.

ⅵ）氷上で10分間静置する.

ⅶ）ヒートショックを与える（マイクロチューブを42℃の投げ込みヒーターを入れた水槽に1分間入れ，その後，氷上に2分間静置する）.

ⅷ）SOC培地を250μLずつ入れて大腸菌を回復させる.

ⅸ）37℃のインキュベーターで10分間静置する.

ⅹ）マイクロチューブの*E. coli* DH5α Competent Cells混合液を，２枚のLB/アンピシリン寒天培地に対して，各々10μLと１μLずつ入れる（メーカーのコンピテントセルは，形質転換効率が通常の100～1000倍程度高いと言われているので，遺伝子組換えキットの時の1/10量と1/100量にした）.

ⅹⅰ）プレートを逆さまにして，37℃のインキュベーターで１日間培養し，生じたコロニー数をカウントするとともに紫外線を照射してコロニーの蛍光の有無を調べる.

② コンピテントセルを用いた遺伝子導入の結果

遺伝子組換え実験キットと同様に，100μLの *E. coli* DH5α Competent Cells混合液を入れたものは,効率よく遺伝子が導入されたためLB/アンピシリン寒天培地全体が白くなるほど大腸菌が大増殖し，コロニー数をカウントすることは不可能であった.

これに紫外線を照射すると,LB/アンピシリン寒天培地全体が緑色の蛍光を発していた（図４）.

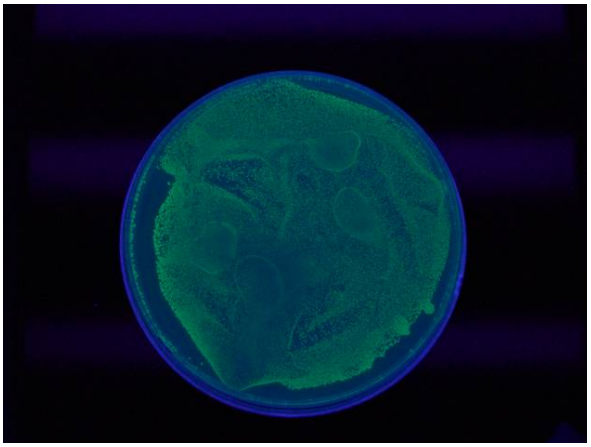

図４　100μLの*E. coli* DH5α Competent Cells混合液から生じた大腸菌コロニーの蛍光

同様に，10μLの混合液を入れたものも，コロニー数が多すぎてカウントすることが困難であり，結果的には１μLの混合液を入れたものから生じたコロニーの数をカウントした（表５）.

また，これに紫外線を照射したものの写真の一つ

を図５に示した.

表５　1μL の *E. coli* DH5α Competent Cells 混合液から生じた大腸菌コロニーの数

検体番号	コロニー数
Sample1	48
Sample2	135
Sample3	24
Sample4	69
Sample5	13

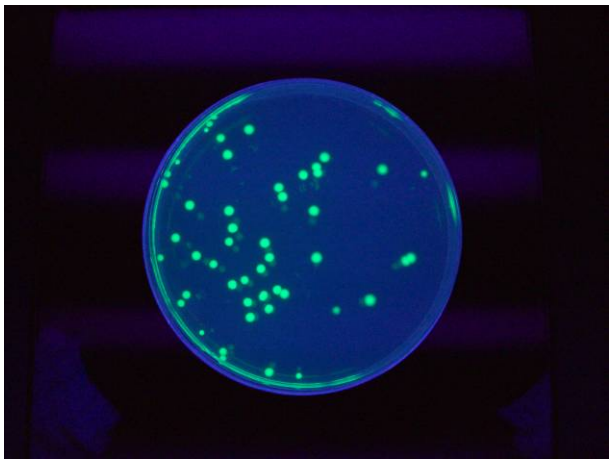

図５　1μL の *E. coli* DH5α Competent Cells混合液から生じた大腸菌コロニーの螢光

１μL の *E. coli* DH5α Competent Cells混合液から生じた大腸菌コロニー数は13個～135個（平均58個）であった. これは, 100倍に希釈をしているので, キットに付属の大腸菌（*E. coli* K-12株）とは単純には比較できないが, 300倍近い遺伝子導入効率であった.

４. 結果と考察

市販の遺伝子組換え実験キットは, 事前の準備や特別な実験装置・器具も必要ではなく, 操作も簡便で結果も視覚的に認識できるなど, 教育目的では有用である.

しかしながら, １万円程度の遺伝子組換え実験キットでは, １班４人の20人分を想定しているため, ５セットしか入っておらず, このままでは40人のクラスではキットを２つ購入する必要がある.

また, 遺伝子の導入効率もあまり良くないので, コロニーがうまく形成されず, 螢光も見ることのできない斑も出たりする可能性がある.

キットに付属品で入手が困難であるものはGFPプラスミドのみであり, 培地や形質転換溶液などは簡単に作ることができる. これらを教員側で準備しておき, また, キットに付属するプラスミドはかなり多めに用意されているので, プラスミドの使用量を減らすことによって, 一つのキットで40人のクラスの実習を行うことも可能と考えられる.

また, 市販のコンピテントセルは, 本実験でも生きた大腸菌を用いて作ったコンピテントセルに対して100倍以上の遺伝子導入効率をもつため, これを用いると, 少量のプラスミドで遺伝子導入実験ができるほか, 形質転換溶液との撹拌不足やヒートショックが不十分であっても, 遺伝子導入が行われ, GFPタンパクを生成するコロニーが形成されて螢光を観察できるものと考えられる.

生徒による実習においては, 反応や培養時間を秒単位で正確に行ったり, また, 短時間で煩雑な操作を行うことも困難であるため, 市販のコンピテントセルを用いるのも一つの方法であると考えられる.

発展として, キットを用いずに遺伝子導入実験を行うことも可能である.

このメーカーの *E. coli* DH5α Competent Cellsには, SOC培地や形質転換効率チェック用のpUC19プラスミドベクターが付属している. 他のメーカーのコンピテントセルもほぼ同様である.

このチェック用のpUC19プラスミドをコンピテントセルに与えて, アンピシリン寒天培地で培養すると遺伝子導入個体のみがコロニーを形成する. また, X-Gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド) を含む, LB/アンピシリン寒天培地で, pUC19プラスミドで形質転換した個体を培養すると青色のコロニーが出現することから, 遺伝子導入を確認することも可能である.

詳しくは *E. coli* DH5α Competent Cells 取扱説明書に記載されているので, これを参照されるとよい.

５. おわりに

遺伝子組換え実験は, 生徒も教員も関心の高い実験であるが, その理論的裏付けを熟知しておく必要がある. 特に, キットを用いて実験を行うとブラックボックスであり, 結果のみを見て満足してしまうことがある.

この辺りは, 指導者である教員が十分に配慮する必要があり, また, これを防ぐ意味でもキットをそのまま使うのではなく, 授業等で使いやすいように改良したりする工夫も必要であり, また, キットを

使わずに実習を計画することも重要であると考えられる.

次に，教育目的の遺伝子組換え実習であるからこそカルタヘナ法や遺伝子組換え生物規制法の主旨をよく理解しておく必要がある.

遺伝子組換え実験中の拡散防止策としてはP1レベルであるため，遺伝子組換え実験中であることを示す貼紙をするなどして外部からみだりに人が入らないように講ずるほか,実験中は扉や窓を閉めておく.また，実験時のマスクや安全ゴーグルの着用，実験終了時の手洗とアルコール等による消毒，使用器具類や遺伝子導入生物の滅菌をする.

GFPタンパクを生成するような遺伝子導入生物を教材として保管する場合も，これらの生物が漏出しない容器に入れ，遺伝子組換え生物である旨の表示をする.

教育目的の遺伝子組換え実験では研究機関に求められているような安全性を検討する委員会の設置は必須ではないが，実験方法等については実験の経験者や関係者と綿密な打合せを行うほか，事故やトラブル発生時における対応の体制を取っておくことが大切である.

また，遺伝子組換え実験は，科学のみではなく技術や社会との関連性が強い．そのため，単に遺伝子組換え実験を理科の実験の一つとして扱うだけではなく，遺伝子組換え食品，医薬品，クローン技術など，社会におけるリスクと利便性など，教育（特にリスクコミュニケーション教育）の面から扱うことも今後は必要になってくると考えられる.

謝辞

本実習を進めるにあたり，東京大学環境安全センターの刈間理介先生には，理数系教員指導力向上研修の場を含め，遺伝子組換え実験やコンピテントセルに代表される微生物の取り扱いに対してご指導を頂きました．この場をお借りしましてお礼申し上げます.

参考文献

1) 大藤道衛:適切な実験を行うためのバイオ実験の原理(2006)
2) 島津理化：遺伝子組換え実験キット Basic Version 取扱説明書
3) タカラバイオ株式会社：*E. coli* DH5α Competent Cells 取扱説明書
4) 田村隆明：改訂第3版遺伝子工学実験ノート上,羊土社(2009)
5) 田村隆明：改訂第3版遺伝子工学実験ノート下,羊土社(2009)
6) 田村隆明:超基本バイオ実験ノート,羊土社,2005.
7) 農林水産先端技術産業振興センター：STAFFバイオテクノロジー出前講座テキスト集(2005)
8) 文部科学省HPの「ライフサイエンスにおける安全の取組み」 http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen.html(2010.2.9)